

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



(51) Internationale Patentklassifikation 6 : A61L 27/00		A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/00152 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 7. Januar 1999 (07.01.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE98/01782		(81) Bestimmungstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 29. Juni 1998 (29.06.98)		(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 27. Mai 1999 (27.05.99)	
(30) Prioritätsdaten: 197 27 497.8 27. Juni 1997 (27.06.97) DE		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(71)(72) Anmelder und Erfinder: BADER, Augustinus [DE/DE]; Hinter den langen Höfen 16, D-31275 Immensen (DE). STEINHOFF, Gustav [DE/DE]; Heckendamm 12, D-31303 Burgdorf (DE). HAVERICH, Axel [DE/DE]; Dorfstrasse 8, D-30916 Isernhagen (DE).			
(74) Anwälte: LÄUFER, Martina usw.; Gramm, Lins & Partner GbR, Theodor-Heuss-Strasse 1, D-38122 Braunschweig (DE).			

(54) Title: **BIOSYNTHETIC TRANSPLANT AND METHOD FOR THE PRODUCTION THEREOF**

(54) Bezeichnung: **BIOARTIFIZIELLES TRANSPLANTAT UND VERFAHREN ZU SEINER HERSTELLUNG**



(57) Abstract

The invention relates to a recipient-specific transplant consisting of interstitial tissue comprising various differentiated autologously or genetically engineered and modified quasi-autologously colonized cells. In order to produce said transplant, allogenic or xenogenic tissue or material is subjected to enzymatic or chemical treatment to obtain a non-denatured practically cell-free collagen matrix with a loosened structure, which can be as fully and directly re-colonized with the desired cells as possible. The transplant thus obtained can be used immediately.



EP 0 989 867 B1

EUROPÄISCHE PATENTSCHRIFT

(11)

European Patent Office

Office européen des brevets

(12)

EUROPÄISCHE PATENTSCHRIFT

(45) Veröffentlichungstag und Bekanntmachung des

Hinweises auf die Patenterteilung:
24.04.2002 Patentblatt 2002/17

(21) Anmeldenummer: 98341248.1

(22) Anmeldatum: 28.06.1998

(51) Int Cl.: A61L 27/00

(86) Internationale Anmeldenummer:
PCT/DE98/01782

(87) Internationale Veröffentlichungsnummer:
WO 9901452 (07.01.1999 Gazette 1999/01)

(54) BIOARTIFIZIELLES TRANSPLANTAT UND VERFAHREN ZU SEINER HERSTELLUNG

BIOSYNTHETIC TRANSPLANT AND METHOD FOR THE PRODUCTION THEREOF

TRANSPLANT BIOSYNTHETIQUE ET SON PROCEDE DE PRODUCTION

(84) Benannte Vertragsstaaten:
CH DE ES FR GB IT NL

(30) Priorität: 27.06.1997 DE 19727487

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
05.04.2000 Patentblatt 2000/14

(73) Patentinhaber:

• Bader, Augustinus

31275 Lehrte (DE)

• Steinhoff, Gustav

31303 Burgdorf (DE)

• Haerterich, Axel

30916 Isernhagen (DE)

• Bösi, Raphael, Dr. rer. nat., Dipl.-Chem. et al

Patent- und Rechtsanwälte

Barndahl, Pagenberg - Dost.

Altenburg, Geiseler, Isernhagen

Postfach 88 06 20

81633 München (DE)

(74) Vertreter:

Steinhoff, Gustav

31303 Burgdorf (DE)

• Haerterich, Axel

30916 Isernhagen (DE)

• Bader, Augustinus

31275 Lehrte (DE)

• Steinhoff, Gustav

31303 Burgdorf (DE)

• Haerterich, Axel

30916 Isernhagen (DE)

(72) Erfinder:

• Bader, Augustinus

31275 Lehrte (DE)

• Steinhoff, Gustav

31303 Burgdorf (DE)

• Haerterich, Axel

30916 Isernhagen (DE)

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:

05.04.2000 Patentblatt 2000/14

(73) Patentinhaber:

• Bader, Augustinus

31275 Lehrte (DE)

• Steinhoff, Gustav

31303 Burgdorf (DE)

• Haerterich, Axel

30916 Isernhagen (DE)

(74) Erfinder:

• Bader, Augustinus

31275 Lehrte (DE)

• Steinhoff, Gustav

31303 Burgdorf (DE)

• Haerterich, Axel

30916 Isernhagen (DE)

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:

05.04.2000 Patentblatt 2000/14

(73) Patentinhaber:

• Bader, Augustinus

31275 Lehrte (DE)

• Steinhoff, Gustav

31303 Burgdorf (DE)

• Haerterich, Axel

30916 Isernhagen (DE)

(74) Erfinder:

• Bader, Augustinus

31275 Lehrte (DE)

• Steinhoff, Gustav

31303 Burgdorf (DE)

• Haerterich, Axel

30916 Isernhagen (DE)

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:

05.04.2000 Patentblatt 2000/14

(73) Patentinhaber:

• Bader, Augustinus

31275 Lehrte (DE)

• Steinhoff, Gustav

31303 Burgdorf (DE)

• Haerterich, Axel

30916 Isernhagen (DE)

(74) Erfinder:

• Bader, Augustinus

31275 Lehrte (DE)

• Steinhoff, Gustav

31303 Burgdorf (DE)

• Haerterich, Axel

30916 Isernhagen (DE)

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:

05.04.2000 Patentblatt 2000/14

(73) Patentinhaber:

• Bader, Augustinus

31275 Lehrte (DE)

• Steinhoff, Gustav

31303 Burgdorf (DE)

• Haerterich, Axel

30916 Isernhagen (DE)

(74) Erfinder:

• Bader, Augustinus

31275 Lehrte (DE)

• Steinhoff, Gustav

31303 Burgdorf (DE)

• Haerterich, Axel

30916 Isernhagen (DE)

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:

05.04.2000 Patentblatt 2000/14

(73) Patentinhaber:

• Bader, Augustinus

31275 Lehrte (DE)

• Steinhoff, Gustav

31303 Burgdorf (DE)

• Haerterich, Axel

30916 Isernhagen (DE)

(74) Erfinder:

• Bader, Augustinus

31275 Lehrte (DE)

• Steinhoff, Gustav

31303 Burgdorf (DE)

• Haerterich, Axel

30916 Isernhagen (DE)

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:

05.04.2000 Patentblatt 2000/14

(73) Patentinhaber:

• Bader, Augustinus

31275 Lehrte (DE)

• Steinhoff, Gustav

31303 Burgdorf (DE)

• Haerterich, Axel

30916 Isernhagen (DE)

(74) Erfinder:

• Bader, Augustinus

31275 Lehrte (DE)

• Steinhoff, Gustav

31303 Burgdorf (DE)

• Haerterich, Axel

30916 Isernhagen (DE)

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:

05.04.2000 Patentblatt 2000/14

(73) Patentinhaber:

• Bader, Augustinus

31275 Lehrte (DE)

• Steinhoff, Gustav

31303 Burgdorf (DE)

• Haerterich, Axel

30916 Isernhagen (DE)

(74) Erfinder:

• Bader, Augustinus

31275 Lehrte (DE)

• Steinhoff, Gustav

31303 Burgdorf (DE)

• Haerterich, Axel

30916 Isernhagen (DE)

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:

05.04.2000 Patentblatt 2000/14

(73) Patentinhaber:

• Bader, Augustinus

31275 Lehrte (DE)

• Steinhoff, Gustav

31303 Burgdorf (DE)

• Haerterich, Axel

30916 Isernhagen (DE)

(74) Erfinder:

• Bader, Augustinus

31275 Lehrte (DE)

• Steinhoff, Gustav

31303 Burgdorf (DE)

• Haerterich, Axel

30916 Isernhagen (DE)

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:

05.04.2000 Patentblatt 2000/14

(73) Patentinhaber:

• Bader, Augustinus

31275 Lehrte (DE)

• Steinhoff, Gustav

31303 Burgdorf (DE)

• Haerterich, Axel

30916 Isernhagen (DE)

(74) Erfinder:

• Bader, Augustinus

31275 Lehrte (DE)

• Steinhoff, Gustav

31303 Burgdorf (DE)

• Haerterich, Axel

30916 Isernhagen (DE)

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:

05.04.2000 Patentblatt 2000/14

(73) Patentinhaber:

• Bader, Augustinus

31275 Lehrte (DE)

• Steinhoff, Gustav

31303 Burgdorf (DE)

• Haerterich, Axel

30916 Isernhagen (DE)

(74) Erfinder:

• Bader, Augustinus

31275 Lehrte (DE)

• Steinhoff, Gustav

31303 Burgdorf (DE)

• Haerterich, Axel

30916 Isernhagen (DE)

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:

05.04.2000 Patentblatt 2000/14

(73) Patentinhaber:

• Bader, Augustinus

31275 Lehrte (DE)

• Steinhoff, Gustav

31303 Burgdorf (DE)

• Haerterich, Axel

30916 Isernhagen (DE)

(74) Erfinder:

• Bader, Augustinus

31275 Lehrte (DE)

• Steinhoff, Gustav

31303 Burgdorf (DE)

• Haerterich, Axel

30916 Isernhagen (DE)

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:

05.04.2000 Patentblatt 2000/14

(73) Patentinhaber:

• Bader, Augustinus

31275 Lehrte (DE)

• Steinhoff, Gustav

31303 Burgdorf (DE)

• Haerterich, Axel

30916 Isernhagen (DE)

(74) Erfinder:

• Bader, Augustinus

31275 Lehrte (DE)

• Steinhoff, Gustav

31303 Burgdorf (DE)

• Haerterich, Axel

30916 Isernhagen (DE)

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:

05.04.2000 Patentblatt 2000/14

(73) Patentinhaber:

• Bader, Augustinus

31275 Lehrte (DE)

• Steinhoff, Gustav

31303 Burgdorf (DE)

• Haerterich, Axel

30916 Isernhagen (DE)

(74) Erfinder:

• Bader, Augustinus

31275 Lehrte (DE)

• Steinhoff, Gustav

31303 Burgdorf (DE)

• Haerterich, Axel</

Materials durch möglichst vollständige Besiedlung mit dem jeweils gewünschten, autologen Zellen des Empfängers oder mit gänzlich modifizierten für den Empfänger angepaßten Zellen, wobei die Besiedlung des Materials örtlich mit verschiedenen differenzierten autologen Zellen erfolgt, wodurch ein unmittelbar einsetzbares Transplantat erhalten wird.

[0012] Aus der US-PS 5 336 816 ist bereits ein Verfahren zur Zubereitung eines Gewebes auf Collagen-Basis für die Transplantation bekannt, welches mit Hilfe der chemischen Vorbehandlung und Zellentfernung, Kryobehandlung, Trockenstabilisierung, Trocknung, Rehydrierung und Zellrekonstitution ein bioartielles Transplantat mit folgenden Eigenschaften ermöglicht: a) es enthält eine extrazelluläre Protein- und Collagen-Matrix, die möglicherweise vom Wirt remodelliert und repariert werden kann, b) es stellt eine intakte Membran-Grundlage für die erforderliche Wiederherstellung mit lebensfähigen Endothelzellen dar, c) es ist primär keine Immunantwort beim Wirtsherrn, d) es zytizidien nicht und e) es kann einfach bei Verletzung erneuert werden. Das bekannte Verfahren beruht auf dem Konzept, daß das Transplantat eine möglichst "immun-nutrale" Stütz-Matrix gebildet werden soll, die dann vom Transplantations-Empfänger im Körper umgebaut und remodelliert werden kann. Zur Erfüllung dieses Vorgangs ist auch die Möglichkeit anschließender Besiedlung des nach dem Verfahren hergestellten Transplantates vorgesehen.

[0013] Um zu verhindern, daß die Matrix vom Körper des Transplantat-Empfängers als fremd erkannt wird, ist eine Präparation mit bestimmten biologischen Grundmaterialien in eine Stabilisierungslösung eingeglegt, um Strukturen zu vermeiden. Diese Stabilisierungslösung kann Antioxidantien, Quellmittel, Antiothiok, Protease-Inhibitoren und auch Relaxantien für glatte Muskulatur enthalten. Dann wird das vorbehandelte Gewebe in eine Alkalinitätsregelungslösung eingefügt, die im allgemeinen einen geeigneten Puffer, Salz, ein Antitubikum, ein oder mehrere Detergencien, ein oder mehrere Protease-Inhibitoren und ein oder mehrere Enzyme enthält. Die so erhaltenen extrazelluläre Matrix können nun mit einem verneintenden Mittel, wie Gutaraldehyd, fixiert und bis zur Transplantation gelagert werden. Ansonsten wird sie einer üblichen Kryobehandlung unterzogen. Im Laufe dieser Kryobehandlung kann das Produkt bereit steril verpackt werden. Das Gewebe wird dann bei niedriger Temperatur unter Vakuumbedingungen einer möglichst schnellen Gefriertröcknung unterzogen. Diese Gefriertröcknung erfolgt offenbar als zusätzliche Matrixhülle zur Vermeidung von Reaktionen, die angeblich bei getrocknetem Material verglichen mit frischem oder cryokonserviertem Material weniger Reaktionen verursachen. Das Material soll dann vorzugsweise in diesem

Zustand gelagert und transportiert werden. Vor einer Transplantation wird das Gewebe rehydriert. Die Rehydrierung kann in Salz- oder Ringer-Lösung erfolgen. Weiterer Zusatz-Protase-Inhibitor(en) enthalten. Weitere Zusatzstoffe können enthalten sein, z.B. Diphosphonate zur Inhibition alkalinärer Phosphatase und Unterdrückung der Katalyzierung, weiterhin Mittel zur Anregung der Neovaskularisierung und Wirtszellen-Infiltration nach der Transplantation, oder die Rehydrierung kann auch in einem Vernetzungsmittel wie Gutaraldehyd durchgeführt werden. Als zusätzliche Maßnahme ist schließlich die Besiedlung mit immuntoleranten lebensfähigen Zellen in vitro oder in vivo (nach der Transplantation) vorgesehen.

[0014] Das zentrale Konzept dieses bekannten Verfahrens besteht darin, eine extrazelluläre quasi "neutrale" Matrix zu erhalten, die gut eingebaut wird und keine Reaktionen hervorruft. Die Befestigung liegt dabei auf einer "Neutralisierung" der Matrix durch unter Umständen zahlreiche chemische Behandlungsschritte mit Enzymen, Detergencien, Antiothiok, Protease-Inhibitoren usw.. Ein weiterer Schwierigkeit liegt auf der guten Lager- und Transporttauglichkeit, die durch die Cyrokonservierung und Trocknung erreicht wird, wobei gleichzeitig eine weitere "Neutralisierung" der Matrix stattfinden soll.

[0015] Das bekannte Verfahren - und damit auch das danach erhaltenne Transplantat - weist jedoch noch gravierende Nachteile auf. So hat es sich gezeigt, daß die polymorphe Collagenmatrix auch bei schonendem Einfreren und Trocknen Strukturveränderungen unter Reduzierung der mechanischen Stabilität und Elastizität erleidet muss, da in vitro-Versuche zeigen, daß die Zellen bei einer Wiederbesiedlung auf einer vorher getrockneten oder cryobehandelten Collagen-Matrix wesentlich schlechter wieder einwachsen. Die Möglichkeit einer Renaturalisierung des Transplantats im Empfänger-Körper wird dadurch sehr behindert oder gebunden.

[0016] Ferner erscheint der Weg bedenklich, eine frei liegende "neutralisierte" Collagen-Matrix zu schaffen.

[0017] Um zu verhindern, daß die Matrix vom Körper

der Transplantat-Empfänger als fremd erkannt wird, ist eine Präparation mit bestimmten biologischen Grundmaterialien in eine Stabilisierungslösung eingeglegt, um Strukturen zu vermeiden. Diese Stabilisierungslösung kann Antioxidantien, Quellmittel, Antiothiok, Protease-Inhibitoren und auch Relaxantien für glatte Muskulatur enthalten. Dann wird das vorbehandelte Gewebe in eine Alkalinitätsregelungslösung eingefügt, die im allgemeinen einen geeigneten Puffer, Salz, ein Antitubikum, ein oder mehrere Detergencien, ein oder mehrere Protease-Inhibitoren und ein oder mehrere Enzyme enthält. Die so erhaltenen extrazelluläre Matrix können nun mit einem verneintenden Mittel, wie Gutaraldehyd, fixiert und bis zur Transplantation gelagert werden. Ansonsten wird sie einer üblichen Kryobehandlung unterzogen. Im Laufe dieser Kryobehandlung kann das Produkt bereit steril verpackt werden. Das Gewebe wird dann bei niedriger Temperatur unter Vakuumbedingungen einer möglichst schnellen Gefriertröcknung unterzogen. Diese Gefriertröcknung erfolgt offenbar als zusätzliche Matrixhülle zur Vermeidung von Reaktionen, die angeblich bei getrocknetem Material verglichen mit frischem oder cryokonserviertem Material weniger Reaktionen verursachen. Das Material soll dann vorzugsweise in diesem

Grund, die vollständige Entfernung antigen-reaktiver Zellen und anderer antigener Gewebekomponenten aus der Zellmatrix gelingt. Die Collagen-Matrix wird dann jedoch nicht in weiteren Behandlungsschritten immunologisch "neutralisiert", oder in ihrer Struktur verändert.

[0018] Als Ausgangsmaterial dient bei der Erfindung ein allogenes oder xenogenes Material, das die Grundstruktur für das gewünschte Gewebe, Gefäß oder Organ zur Verfügung stehen soll. Im Einzelfall könnte hier auch ein autologes Material verwendet werden, das dem späteren Transplantat-Empfänger zuvor entnommen wurde. Erfindungsgemäß soll die Azellularisierung dieses Ausgangsmaterials ausschließlich durch schnerende Zellentfernung und anschließendes, ggf. reichliches Spülén mit steriler wässriger Lösung erfolgen. Die schnerende Zellentfernung kann entweder durch schneende enzymatische Zellabtragung, beispielsweise durch Eintragen des Gewebes bzw. Matrix in Trypsin-Lösung, erfolgen oder alternativ mit Hilfe eines chemisch zellabtötenden Mittels, vorzugsweise mit Hilfe eines ionenspezifischen Komplexbinders.

[0019] Im Falle der enzymatischen Zellabtragung werden durch das Verdauungsenzym Bindungsstellen in der Verankzung der Zellen mit ihrer Umgebung gelöst. Dies geschieht vorzugsweise durch Einlegen des Gewebes bzw. Materials in Trypsin-Lösung. Dieser Trypsin-Lösung kann bei Bedarf EDTA, EGTA, Triton oder TNH Zugesezt sein. Durch Einsetzung der Zeldauer, während dieser das Enzym auf das Gewebe einwirkt, wird das Maß der Abverdauung gesteuert und es wird vermieden, daß ein Angriff auf die Collagen-Matrix selbst erfolgt. Die Trypsinbehandlung bewirkt auch eine die Neubildung erlaubt wird.

[0020] Alternativ wird ein chemisch zellabtötendes Mittel verwendet, das auf beiläufige andere chemische Weise die Zellen an ihrer Verankzung zur Collagen-Matrix löst. Vorzugsweise ist vorgesehen, daß ein ionenspezifischer Komplexbildner verwendet wird, der den Zellen essentielle Ionen entzieht und so eine Auflösung verhindert. Durch die Komplexierung z.B. von Calcium wird die Bindung der Zellen unterbrochen und die Zell-Matrixbindung über Integrine aufgehoben.

[0021] Als ionenspezifischer Komplexbildner kann beispielsweise das calciumspezifische EGTA (Ethylen-glykol- bis-(2-aminoethyl)-äthoxyäsure) eingesetzt werden. EGTA wird vorzugsweise kurzzeitig und hochdosiert eingesetzt. Auch andere Komplex- bzw. Chelatbildner, wie EDTA (Ethylenaminoacidsigäure), Citra oder Ethylenammin oder sonstige chemisch zellabtötende und abtötende Mittel, die die Collagen-Poteststruktur nicht angreifen, können verwendet werden. So bieten sich weiterhin an: BAPTA/AM (ein zellpermeable Calcium-Chelator) DMSO, Gadolinium, Dastamoxam, Desferrioxamin, Hexadentat oder auch Aminocarboxylat.

[0022] Die vorgenannten Mittel können einzeln oder

in Mischungen eingesetzt werden, sie können durch andere Zusätze ergänzt werden, wie z.B. durch Tenside, die die Ablösung der Zellen erleichtern können (z.B. TRITON®). Vorzugsweise ist das chemisch zellabtötende Mittel frei von Enzymen, die bei langer Einwirkung Collagen angreifen können, wie z.B. Trypsin. Durch die genannten Mittel werden die Zellen gleichzeitig abgetötet und abgelöst. Das Abtöten kann durch intensives Spülén oder eine entsprechende, die Zellen mechanisch abscherende Behandlung unterstützt werden.

[0023] Ein Vorteil der chemisch-mechanischen Behandlung liegt darin, daß der Behandlungsschritt, in dem die Collagen-Matrix zellfrei gemacht wird, nur deutlich weniger Zeit in Anspruch zu nehmen braucht als bei einer Behandlung mit Trypsin. Hierdurch sinkt anstens die Gefahr, daß die Collagen-Matrix selbst angegriffen wird, und zweitens bleibt die Tefatstruktur besser erhalten, wenn das Substrat nicht zu lange in Lösung gequollen wird. Ein weiterer Vorteil besteht darin, daß durch u.L. kontaminierte Enzyme tierischen Ursprungs vermieden werden können. Ein weiterer Vorteil liegt schließlich darin, daß die Basalmembran intakt bleibt. Beide Vorteile stehen das direkte und gewebespezifische Adhäsionssubstrat für die Endothelzellen dar. Der Glycosylierungsgrad der Matrixproteine beeinflußt auch die Zellmigration und somit ein späteres Einwanderen von Zellen. Die natürliche Form des Collagen-Netzwerks in ihrer dreidimensionalen Verbindung mit anderen Matrixkomponenten und Proteinen kann daher durch die Erfindung erhalten werden.

[0024] Auf die beschriebene Weise wird eine aufgelockerte, jedoch in ihrer Sekundär- und Tertiärstruktur dem nativen polymerisierten Collagen noch weitgehend entsprechende Collagenstruktur erhalten, die für das Einwachsen neuer Zellen, nämlich autologer Zellen des Empfängers oder, falls dies im Einzelfall möglich ist, anderer immunkompetenter Zellen bestens vorbereitet ist.

[0025] Die zellfrei gemachte, aufgelockerte Matrix wird daher allemal kurz zwischenlagern oder sterilisiert (beispielsweise radaktiv mit UV oder Protonenstrahl), oder mit Ethylenoxyd begast, jedoch nicht chemisch weiterbehandelt, sondern prinzipiell sofort, möglichst vollständig mit den jeweils gewünschten Antikörpern oder zellulären Differenzierten, i.a. mit den Empfängerzellen in vitro hergestellt. Diese Besiedlung kann in einem normalen Kulturmedium erfolgen, dem ein Antikörper zugesetzt sein kann. Im Falle der besonderen Schonenden und sachtel verlaufenden Zellablösung durch Komplexbildner kann ggf. eine zusätzliche chemische oder Kryo-Behandlung erfolgen, wenn dies aus besonderen Gründen notwendig erscheint.

[0026] Der Erfinding liegt die Erkenntnis zugrunde, daß eine spätere Abstößungsreaktion erfolgreich befehrt dadurch vermieden werden kann, daß eine vollständige, im Einzelfall auch mehrschichtige Besiedlung der weitestgehend azellulärisierten Matrix mit Immunito-

leranten Zellen, d. h. im allgemeinen mit autologen Zellen des Empfängers, vorgenommen wird. Statt autologer Zellen können auch Zellen anderer Ursprungs verwendet werden, die genetisch so verändert wurden, daß sie für den Transplantat-Empfänger "verträglich" sind. Auf diese Weise wird dem Empfänger ein Transplantat zur Verfügung gestellt, das an allen zugänglichen Stellen mit autologen Zellen bedeckt ist und daher vom Körper des Empfängers nicht als "fremd" erkannt werden wird. Dieses Transplantat wird im Körper den üblichen Umbildungsmechanismen unterworfen werden, so daß es auf natürliche Weise remodelliert, erneuert und unter Zeldifferenzierung weiter angepaßt wird. Das Transplantat ist daher bestens vorbereitet, besonders gut einzuwachsen, umgebaut zu werden und gibt sogar mitzuwachsen. Durch die azellulärisierte Matrix kann eine Vielzahl von Transplantatformen vorgegeben werden. Diese können je nach Anwendungszweck mit verschiedenen autologen Zellen bestückt werden und zwar sowohl auch bereichsweise mit unterschiedlichen autologen Zellen.

[0027] In Weiterbildung der Erfindung ist vorgesehen, daß in die Matrix Wachstumsfaktoren mit eingebracht werden. Hierbei kann es sich vorzugsweise um für die jeweiligen Zellen spezifische Faktoren, wie HGF, VEGF, FGF, EGF oder PDGF handeln. Ebenso können auch Matrixfaktoren wie z.B. Fibronectin oder chemoataktische Faktoren eingesetzt werden.

[0028] In einer bevorzugten Ausführungsform werden die Wachstumsfaktoren bei der Zellbesiedelung eingebracht, indem genetisch modifizierte Zellen verwendet werden, die mit Genen (für den jeweiligen Wachstumsfaktor) transformiert wurden, so daß eine wenigstens transiente Expression an Wachstumsfaktor (en) im Zeitraum nach der Transplantation erfolgt. Die temporäre Expression von Wachstumsfaktor (en) kann helfen, die Akzeptanz des Transplantat zu erhöhen, indem Kapillarisationsprozesse gestoppt oder ausgebaut werden. Für die Transformation bzw. Transfektion der Zellen ist eine geeignete Methode auszuwählen. Es kann sich dabei um die Elektroposition, Liposomale Transfektion, receptorvermittelte Endozytose, Proteincoating oder sonstige gelegnete der bekannten und in der Literatur hinlänglich beschriebenen Verfahren handeln.

[0029] Alternativ kann der Wachstumsfaktor auch direkt in die extrazelluläre Matrix eingebracht werden.

Dies könnte beispielsweise in mikrokapillarer Form oder durch gespeiste e Beschichtung geschehen. Hierdurch soll die Wachstumsfaktor kurzfristig oder über einen bestimmten Zeitraum ab Implantation retaiend in dem Transplantat liegen, so daß zeitweise

eine örtlich hohe Konzentration an Wachstumsfaktor erzeugt wird, von der eine Signifikanz für die Ausbildung von Kapillarisationsprozessen ausgeht.

[0030] Das nach dem Verfahren erhaltenen Transplantat ist unmittelbar einsatzbar. Lagerung und Transport sollte höchst schonend unter sterilen und nicht defi-

dierenden Bedingungen erfolgen. Eine gesonderte Desinfektion oder Rahmierung oder sonstige strukturverändernde Maßnahmen empfehlen sich an dem fertigen Transplantat nicht.

[0031] Insbesondere bei parencymatischen Organen ist die Stimulation, welche Zellen wo aufwuchsen als fremd erkannt wird. Bei röhrenförmigen Gefäßen und Klappen-Transplantaten werden zweckmäßigerweise außen autologe (Mro-)Fibroblasten und innen Endothelzellen verwendet. Die Fibroblasten wachsen mehrschichtig auf und sichern auf diese Weise eine äußerlich intakte Besiedelung mit autologen Zellen, wodurch die Infiltration mit Granulationsgewebe verhindert wird. Das Auftreten der Zellen an der Zellwand auf die Außenseite röhrenförmiger Gefäße kann z. B. mit Hilfe viskoser Flüssigkeiten erfolgen. Die Zellen halten sich dadurch besser auf der äußeren Oberfläche, so daß das Einwachsen erleichtert wird. Es kann eine viskose oder sogar gelartige Lösung Verwendung finden, z.B. Collagen, Plasma oder Fibronogen erhalten kann.

[0032] Die Erfindung umfaßt dementsprechend insbesondere auch bioartifizielle empfangergespezielle Transplantate, welche aus Bereichsweise mit unterschiedlichem autologen Zellen besiedeltem interstitiellem Bindegewebe bestehen. Anstelle von autologen Zellen, die vorher vom Transplantat-Empfänger gewonnen wurden, können auch quasi-autologe Zellen anderer Ursprungs eingesetzt werden, die gentechnisch im Hinblick auf den Empfänger verändert wurden. Die Collagen-Matrix des interstitiellen Bindegewebes soll nach Möglichkeit nirgends mehr freiliegen.

[0033] Handelt es sich bei dem erindigungsgeräten Transplantat um ein Haut-Transplantat, ist es vorzugsweise außen (außer der Körperabgewandten Seite) mit Keratinozyten und innen (Körperseite) mit Zellen mesodermaler Ursprungs bestückt. Auch hierbei sind die Oberflächen jeweils vollständig besiedelt, so daß dort überwiegend keine Collagen-Matrix freiliegt, die auf die Dauer verharrt oder vom Körper als fremd erkannt und deshalb bekämpft werden könnte.

[0034] Neben Hauttransplantaten können auch bioartifizielle Herzkappen, Arterien, sonstige Gefäße, Schädel, Nerven, Knochen, Knorpel, Larynx, Herz, Trachea, Nieren, Mäuse, Diskus intervertebralis oder z. B. Ureteren, Urethra und Blase erhalten werden. Letztere können zur Deckung bei Patienten nach Operationen oder bei angeborenen Missbildungen (z.B. Hypopspadi) verwendet werden.

[0035] Das polymerisierte, praktisch im nativen Zu-

stand befindende Collagen der Transplantat-Matrix ist von einem dem natürlichen Zustand weitgehend entsprechenden hohen mechanischen Stabilität und Elastizität.

Dies ermöglicht, daß das bioartifizielle Transplantat lan-

renzung beim körpereigenen Umbau positiv. Das transplantierte artifizielle Organ wird leichter durch "inneren Umbau" Körperzellen ersetzt, d.h. daß die autologen Zellen die benötigte Matrix innerhalb des Organismus restorieren und durch neue autologe Matrix ersetzten.

[0036] Im folgenden wird die Erfindung anhand von Beispielen beschrieben, die Isolationsprotokolle für die Isolation autologer Zellen und Beispiele für die Durchführung des Verfahrens umfassen:

Beispiele:

Herstellung eines bioartifizielles Transplantats (allgemein)

Gewebeverarbeitung (Zellentfernung) mit Trypsin:

[0037] Das Gewebe wird nach der Entnahme in eine beverzugt 0,05%ige Trypsinlösung gelegt und dort je nach Wandstärke des Materials z.B. 48, 72 oder 96 Stunden belassen. Alternativ kann statt der Zeit die Konzentration der Trypsin-Lösung variiert werden. Das Gewebe soll vollständig mit Trypsinlösung bedeckt sein. Die Flüssigkeit wird vorzugsweise durch Röhren in Bewegung gehalten. Die Temperatur sollte zwischen 25 und 37°C liegen.

[0038] Insbesondere bei sehr festem Gewebe kann zur Unterstützung der Zellablösung zusätzlich eine Veränderung des pH-Wertes oder eine schonende Ultraschall-Behandlung vorgenommen werden.

Gewebeverarbeitung (Zellentfernung) mit Komplex- bzw. Chelatbildner:

[0039] Typischerweise erfolgt die Behandlung des Gewebes durch Immersion in einer 1% EDTA isotonischen Kochsalzlösung bei 4°C für ca. 3 Stunden. Die Behandlungsduar ist von der Konzentration des Komplexbildners abhängig. Bedarfsweise kann auch hier eine Unterstützung der Ablösung, beispielsweise durch Ultraschall, erfolgen.

[0040] Nach Abschluß der enzymatischen oder komplexierenden Ablösung von Zellen und antigenen Gewebezellen wird das Gewebe gespült d.h. mehrfach mit Spülflüssigkeit eingetaucht oder längere Zeit unter Durchfluß von Spülflüssung gespült. Zum Spülen kann schwere Lösung wie z.B. NaCl-Lösung, PBS oder andere verwendet werden. Das Spülen kann mehrere Tage dauern und führt zusätzlich zu einer Entfernung vorwiegend nicht abgeschwemmter Zellkörper.

[0041] Wann die Behandlung mit Komplexbildner bei 4°C vorgenommen wurde, kann auch das Spülen vorzeitig bei dieser Temperatur erfolgen. Dabei sollte wenigstens ca. 2 Stunden gespült werden.

[0042] Falls erforderlich, wird das Gewebe nun in isotonischer Lösung bei Kühlung auf etwa 4°C unter Zusatz von Antibiotika bis zur weiteren Besiedlung steril

gelagert.

[0043] An dieser Stelle ist eine radioaktive Bestrahlung, beispielsweise eine γ -Strahlung, eine Begebung mit Ethylenoxid, eine UV- oder Protonenbestrahlung möglich.

[0044] Bei der Isolation der für die Besiedlung zu verwendenden Zellen (z.B. Endothelialen glatten Muskelzellen, Fibroblasten) können konventionelle Isolationsprotokolle verwendet werden.

[0045] Die Besiedlung erfolgt bei 37°C unter Sterilisierung in einem Medium, dem BSI. Wachstumsaktivator (ECGF) zu gesetzt sein kann. Für eine vollständige Besiedlung ist es vorzuhalt, daß das Kulturmedium ständig zu bewegen und das bewegte Material häufig mit Saft erstoßen in Kontakt zu bringen.

[0046] Die Besiedlung mit verschiedenenartigen Zellen bzw. Zellpopulationen kann auf unterschiedliche Weise erfolgen.

[0047] Ein Vorteil der Erfindung ist, daß die Zellen eine extrazelluläre Matrix in einer weitestgehend der natürlichen Zusammensetzung entsprechenden Form und 3-D-Geometrie vorfinden. Das heißt, daß unter Vermeidung strukturellschädlicher Prozesse, wie z.B. Dehydrierung und Rehydrierung, eine dem physiologischen Zustand nahe kommende extrazelluläre Matrix für die Zellsiedlung verwendbar werden kann. Diese Matrix kann zeitlich gestaffelt besiedelt werden.

[0048] Sofern es sich um Haut handelt, kann das Gewebe zwischenzeitlich auf einem Träger fixiert oder in einem Rahmen eingespannt werden, wodurch dann in die eine Seite mit Zellen bespült wird. Dieses Verfahren kann das Ober- und Unterseite angewendet werden.

[0049] Auch andere Materialien können durch geeignete Einspannen und/oder Abdichten bestimmter Bereiche gezielt besiedelt werden. Beispielsweise kann von oben mit Keratinozyten und unten mit Bindegewebszellen und BSI-Zellen von Hauteingangsgebilden besiedelt werden. Alternativ können von oben zeitlich vor der Besiedlung mit Keratinozyten Zellen von Hautanhangsgebilden aufgegeben werden.

[0050] Rohrartmäßige Transplantate können z.B. zunächst ihnen Durchfluß besiedelt werden, dann abgebunden oder eingespannt und außen besiedelt werden. Bei der Herstellung eines bioartifizielles Gefäßes ist es beispielsweise möglich, von außen Myofibroblasten und innerhalb des Lumens humane Endothelialen aufzugeben. Ziel ist es, das Einwachsen der Zellen in die Wand des Gefäßes und eine Differenzierung der Zellen am Migrationsziel innerhalb der 3D-Mikroumgebung der extrazellulären Matrix zu erreichen. Diese Einwanderung der Zellen in die Matrix stellt ein wesentliches Merkmal und gleichzeitig einen bedeutenden Vorteil der Erfindung dar.

[0051] Die Gefäßbesiedlung von außen kann auch zunächst mit glatten Muskelzellen und danach mit (Mro-)Fibroblasten erfolgen.

[0052] Alternativ können innen, in das Lumen, zunächst Myofibroblasten gegeben werden und danach -

zeitlich so verarbeitet, daß sich eine konfluente Myofibroblasten-2-Zellschicht auf der Endothelhaut - ebenfalls in das Lumen der Endothelien (in Kulturmedium eingesetzt).

[0053] Die Gewinnung der Endothelien und glatten Muskelzellen wird entsprechend dem Stand der Technik durchgeführt.

GEWEBEGEWINNUNG

[0054] Vena saphena-Stücke des peripheren Beins von Patienten von ca. 1 cm Länge werden in heparinisiertes Vollblut gegeben und auf diese Weise in das Leibertein transportiert. Danach erfolgt die Isolation der Endothelien und Myofibroblasten für die weitere Expansion *in vitro*.

ISOLATION UND KULTUR VON ENDOTHELIEN, GLÄTTEN MUSKELZELLEN UND FIBROBLASTEN

1. Materialien

[0055]

- HBSS (Clinect, Salvia, Hamburg)
- PBS, darin Ca^{2+} und Mg^{2+} (Sigma)
- Collagenase A (Boehringer Mannheim)
- M-199 mit L-Glutamin (Sigma), darin 10% (20%) FBS (Sigma)
- Epoctolot Serum
- 100 U/ml Penicillin (Sigma), 100 μ g/ml Streptomycin (Sigma)
- 5000 U/ml Heparin (Heparin Novo, Nordisk, Mainz, Firma von Konservierungsstoffen)
- 6-Well Kulturplatten (Greiner, Frickenhausen, Deutschland)
- Fibronectin Beschichtung

2. Kulturräume

20 3.1. Gewinnung von SMC ("smooth muscle cells" = glatte Muskelzellen) und FB (fibroblasten, Fibroblasten)

[0056] Die Gewinnung erfolgt in folgenden Schritten:

- 21 • mechanische Abrennung der Adventitia (FB) vom deendothelialisierten Gefäß
- Zerkleinerung in 1mm-Stücke
- die Stücke werden mit wenig Medium in eine Kulturnische gegeben
- nach 2-3 Tagen kleben die Gewebekügelchen auf dem Flaschenboden
- die Kulturnischen werden täglich für 8 h senkrecht gestellt.
- 25 3.2 Kultivierung von SMC und FB

[0057] Die Kultivierung erfolgt mit einer Zeldichte von 10000 Zellen/cm² bei 37°C, 95% Luft und 5% CO_2 bei einem Mediumwechsel alle 2 bis 3 Tage bis zur weiteren Konfluenz; dann Typisierung und Passagierung.

[0060] Zu den Figuren:

Figur 1: Aorta des Schweins nach Behandlung (Versuch entsprechend Schritten a) und b) des erfindungsgemäßen Verfahrens). Die Matrix ist aufgelockert und frei von Zellen. Die Zellentfernung erfolgte hier mit Trypsin.

Figur 2: Rasterelektronische Aufnahme der Oberfläche einer mit Trypsin entsprechend der Erfindung aufgelockerten Oberfläche einer Aortenwand. Die Matrixfibillen sind dargestellt.

Figur 3: Aorta des Schweins nach Besiedlung mit Endothelien, die einen Monolayer an der oberflächlichen Lumenseite bilden.

[0061] Alternativ kann anstelle von Humanserum auch FBS oder NCS verwendet werden.

2.2 Kultur von Endothelzellen

[0057] Die Kultivierung erfolgt durch: Inkubation bei 5% CO_2 , 95% Luft bei 37°C unter Mediumwechsel alle 3 Tage. Nach Erreichen der Konfluenz wird zur Ablösung der Zellen eine Lösung mit 0,05% Trypsin und 0,02% EDTA (Sigma) in PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} verwendet (Inkubation 2 bis 3 Minuten bei Raumtemperatur). Alternativ kann eine mechanische Tremierung durch "Ab-schaben" erfolgen. Anschließend wird M-199, darin 20% FBS (zur Trypsinaktivierung) gewaschen. Es wird 10 min bei 300 x 9 zentrifugiert und anschließend resuspendiert. Schließlich wird in 75cm²-Kulturschalen subkultiviert (1. Passage, 2. Passage in 175cm²-Flaschen über ca. 2 Wochen). Diese Zellen werden zur Aussaat auf das Transplantat verwendet.

3. Myofibroblasten

20 3.1. Gewinnung von SMC ("smooth muscle cells" = glatte Muskelzellen) und FB (fibroblasten, Fibroblasten)

25 3.2. Kultivierung von SMC und FB

30 3.3. Kultivierung von Myofibroblasten

35 3.4. Kultivierung von Endothelzellen

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung eines biartifiziellem Transplantats für einen ausgewählten Empfänger, welches die folgenden Schritte umfaßt:

- a) Bereitstellung eines nativen, eine Collagen-Matrix enthaltenden allogenen oder xenogenen Gewebes bzw. Materials,
- b) Entfernung weitgehend aller entzündungsreaktiver Zellen aus der Collagen-Matrix mit Hilfe eines chemisch zellsabsorbierenden Mittels, das frei von Collagen angereicherten Enzymen ist, und anschließendes Spülten mit steriler wässriger Lösung, oder entsprechende mechanische Zellentfernung,
- c) direkte Weiterverarbeitung des Zelltrags, gemachten, durch die Behandlung unter b) aufgelockerten Materials durch möglichst vollständige Bestäubung mit den jeweils gewünschten autologen Zellen des Empfängers oder mit genetisch modifizierten (für den Empfänger angepaßten) Zellen, wobei die Besiedelung des Materials örtlich mit verschiedenen differenzierten autologen Zellen erfolgt, wodurch ein unmittelbar einsatzbereites Transplantat erhalten wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das zu bestehende Material ein röhrenförmiges Gefäß ist, das außen mit Myofibroblasten und innen mit Endothelzellen besiedelt wird.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das obrennförmige Gefäß außen zunächst mit glatten Muskelzellen und danach mit Myofibroblasten und innen zunächst mit Myofibroblasten und danach mit Endothelzellen besiedelt wird.

4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das zu bestehende Material eine sich flach ausdehnende, als Hauttransplantat vor-gesehene Collagen-Matrix ist, die von oben mit Kreatinoyzen und von unten mit Bindegewebszellen besiedelt wird.

5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Matrix von unten mit Bindegewebszellen und Zellen von Hautanhängsgebinden besiedelt wird.

6. Verfahren nach Anspruch 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Matrix von oben zeitlich vor der Besiedelung mit Kreatinoyzen 2 Zellen von Hautanhängsgebinden aufgegeben werden.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, da- durch gekennzeichnet, daß die schonende Zellentfernung durch eine enzymatische Zellverdauung geschieht, vorzugsweise durch Einlegen des Gewebes oder Materials in Trypsin-Lösung.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, da- durch gekennzeichnet, daß die schonende Zellentfernung mit Hilfe eines chemisch zellsabsorbierenden Mittels erfolgt, vorzugsweise mit Hilfe eines ionenspezifischen Komplexbildners, insbesondere EDTA oder EGTA.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, da- durch gekennzeichnet, daß das Material zwischen Schritt a) und b) und/oder zwischen Schritt b) und c) in isotonischer Lösung bei Kühlung auf vorzugsweise 4 °C und unter Zusatz von Antiholika schonend sterilisiert wird, zwischengelagert und/oder gegebenenfalls sterilisiert wird, vorzugsweise durch Be-gasen oder Bestrahen, insbesondere mit γ -Strahlen, UV oder Protonen.

10. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Aufbringen der Zellen auf die Außenseite röhrenförmiger Gefäßes mit Hilfe visko-ser Flüssigkeiten erfolgt.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, da- durch gekennzeichnet, daß in die Matrix zusätz-lich wogtiges ein Wachstumsfaktor, Mainfaktor oder chemiotaktischer Faktor eingebracht wird, vor-zugsweise mit Hilfe der Zellen bei der Besiedelung, oder vor der Besiedelung durch Einbringen des Wachstumsfaktors in die azellulärseire Matrix, oder nach der Besiedelung durch Einbringen des Wachstumsfaktors in die besiedelte Matrix.

12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekenn-zeichnet, daß die Besiedelung genetisch modi-fizierter Zellen verwendet werden, die mit Wach-stumsfaktoren (codierenden Genen transformierte oder transfiziert sind).

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, da- durch gekennzeichnet, daß das enthaltene Trans-plantat für Lagerung und Transport steril unter de-hydrerenden Bedingungen gelagert wird.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, da- durch gekennzeichnet, daß das collagenalige allogene oder xenogene Gewebe oder Material Herzklappen, Haut, Gefäße, Arterien, Sehnen, Co-mota, Knochen, Trachea, Nerven, Minis-kus, Diskus intervertebralis, Utrateren, Urethra und Blase umfaßt.

15. Biartifizielles empfängerspezifisches Transplan-tat, welches aus bereichswise mit verschiedenen dif-

terenzierten autologen oder gentechnisch modifizierten für den Empfänger angepaßten Zellen bestehen im interstitiellen Bindegewebe bestehen, insbesondere erhältlich durch ein Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14.

16. Transplant nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um ein parenchymatisches Organ handelt.

17. Transplant nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um eine biaurikuläre Herzklappe handelt, welche außen menschlich mit Myofibroblasten und innen mit Endothelzellen bestellt ist, wobei die Oberflächen jeweils vollständig bestellt sind, so daß dort weitgehend keine Collagen-Matrix freiliegt.

18. Transplant nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um ein Hauttransplantat handelt, welches außen (außer der Körperfettschicht) mit Keratinozyten und innen (Körperfett) mit Zellen mesodermalem Ursprungs bestellt ist, wobei die Oberflächen jeweils vollständig bestellt sind, so daß dort überwiegend keine Collagen-Matrix freiliegt.

Claims

1. Prozess für die Herstellung eines biaurikulären Transplant für einen ausgewählten Empfänger, welches die folgenden Schritte umfaßt:

- provision of a native allogenic or xenogenic tissue or material containing a collagen matrix,
- removal of substantially all antigen-reactive cells from the collagen matrix with the aid of a chemical cell-detaching agent λ which is free of enzymes attacking collagen, and subsequent rinsing with sterile aqueous solution, or corresponding mechanical cell removal,
- direct reprocessing of the material, which is rendered cell-free and loosened by the treatment under b) as complete as possible colonization with the autologous cells of the recipient which are desired in each case or with genetically modified cells suited to the recipient, the colonization of the material being carried out locally with various differentiated autologous cells, by means of which an immediately ready-for-use transplant is obtained.

2. Prozess according to Claim 1, characterized in that the material to be colonized is a tubular vessel which is colonized outside with myofibroblasts and inside with endothelial cells.

3. Prozess according to Claim 2, characterized in that the tubular vessel is colonized outside first with smooth muscle cells and then with myofibroblasts and inside first with myofibroblasts and then with endothelial cells.

4. Prozess according to Claim 1, characterized in that the material to be colonized is a collagen matrix extending fatty and intended as a skin transplant, which is colonized from above with keratinozytes and from below with connective tissue cells.

5. Prozess according to Claim 4, characterized in that the matrix is colonized from below with connective tissue cells and cells of skin appendages.

6. Prozess according to Claim 4 or 5, characterized in that the cells of skin appendages are placed on the matrix from above prior to the colonization with keratinozytes.

7. Prozess according to one of Claims 1 to 7, characterized in that the gentle cell removal takes place by means of an enzymatic cell digestion, preferably by putting the tissue or material into trypsin solution.

8. Prozess according to one of Claims 1 to 7, characterized in that the gentle cell removal is carried out with the aid of a chemical cell-detaching agent, preferably with the aid of an ion-specific complexing agent, in particular EDTA or EGTA.

9. Prozess according to one of Claims 1 to 8, characterized in that the material is intermediate stored aspischließlich between steps a) and b) and/or between steps b) and c) in isotonic solution with cooling to preferably 4°C and with addition of antibiotics and/or optionally gently sterilized, preferably by treatment with gas or irradiation, in particular with γ -rays, UV or protons.

10. Prozess according to Claim 2, characterized in that the application of the cells to the outside of tubular vessels is carried out with the aid of viscous liquids.

11. Prozess according to one of Claims 1 to 10, characterized in that at least one growth factor, matrix factor or chemoattractant factor is additionally introduced into the matrix, preferably with the aid of the cells during colonization or before colonization by introducing the growth factor into the acellularized matrix, or after colonization by introducing the growth factor into the colonized matrix.

12. Prozess according to Claim 11, characterized in that, for colonization, genetically modified cells are used which have been transformed or transfected

with genes encoding growth factor(s);

13. Prozess according to any one of Claims 1 to 12, characterized in that the transplant obtained is stored aseptically under dehydrating conditions for storage and transport.

14. Prozess according to one of Claims 1 to 13, characterized in that the collagen-containing allogenic or xenogenic tissue or material comprises heart valves, skin, vessels, aortas, tendons, cornea, cartilage, bone, trachea, nerves, meniscus, intervertebral disk, ureters, urethra and bladder.

15. Bioritifical recipient-specific transplant which consists of interstitial connective tissue colonized regionally with various differentiated autologous or genetically modified cells suited to the recipient, in particular obtainable by a process according to one of Claims 1 to 14.

16. Transplant according to Claim 15, characterized in that it is a pacemachymatous organ.

17. Transplant according to Claim 15, characterized in that it is a bioritifical heart valve which outside is colonized in multilayered form with myofibroblasts and inside with endothelial cells, the surfaces in each case being completely colonized such that substantially no collagen matrix is exposed there.

18. Transplant according to Claim 15, characterized in that it is a skin transplant which is colonized outside (on the side facing away from the body) with keratinozytes and inside (body side) with cells of mesodermal origin, the surfaces in each case being completely colonized such that substantially no collagen matrix is exposed there.

19. Prozess für die Herstellung eines biaurikulären Transplant für einen ausgewählten Empfänger, umfassend die folgenden Schritte:

- provision of a native allogenic or xenogenic tissue or material containing a collagen matrix,
- removal of substantially all antigen-reactive cells from the collagen matrix with the aid of a chemical cell-detaching agent λ which is free of enzymes attacking collagen, and subsequent rinsing with sterile aqueous solution, or corresponding mechanical cell removal,
- direct reprocessing of the material, which is rendered cell-free and loosened by the treatment under b) as complete as possible colonization with the autologous cells of the recipient which are desired in each case or with genetically modified cells suited to the recipient, the colonization of the material being carried out locally with various differentiated autologous cells, by means of which an immediately ready-for-use transplant is obtained.

Re vindications

1. Prozess pour fabriquer un transplant biauriculaire pour un receveur sélectionné, comprenant les étapes suivantes:

a) préparation d'un tissu ou d'un matériau allo-génique ou xénogénique, contenant une matrice de collagène,

b) retrait dans une large mesure de toutes les cellules réactives à l'antigène, à partir de la matrice de collagène à l'aide d'un milieu réalisant une dissolution chimique des cellules et qui est libre d'enzymes agressifs pour la collagène, puis lavage avec une solution aquouse stérile, ou déminéralisation mécanique correspondante des cellules,

c) poursuite directe du traitement de la matière

débarrassée des cellules, qui est effectuée par le traitement exécuté en b), au moyen d'un polymérisant aussi compléte que possible avec des cellules autochtones respectivement déstérilisées ou recouvert ou avec des cellules modifiées génétiquement adaptées au receveur, le polymérisant de la matière s'effectuant localement avec les différentes cellules autochtones différentes, ce qui permet d'obtenir un transplant prêt à être directement utilisé.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la matière à peupler est un vaisseau de forme tubulaire, qui est peuplé extérieurement de myofibroblastes et intérieurement par des cellules endothéliales.

3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que le vaisseau de forme tubulaire est peuplé extérieurement tout d'abord par des cellules musculaires lisses, puis par des myofibroblastes et intérieurement tout d'abord par des myofibroblastes et cellules lisses, puis par des myofibroblastes et intérieurement tout d'abord par des myofibroblastes, puis avec de l'endothélium.

4. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la matière à peupler est une matrice de collagène qui s'étend à plat, est prévue en tant que transplant de peau et est peuplée à partir du haut par des kératinozytes et à partir du bas par des cellules conjonctives.

5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que la matière est peuplée à partir du bas par des cellules conjonctives et par des cellules phanéres.

6. Procédé selon la revendication 4 ou 5, caractérisé en ce qu'avant le peuplement avec des kératinozytes, des phanétes sont ajoutées à partir du haut à la matière.

7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que l'élimination des cellules avec ménagements est réalisée au moyen d'une digestion enzymatique des cellules, de préférence par l'acésine ou de la matière dans une solution de trypside.

8. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que l'élimination des cellules avec ménagements est réalisée à l'aide d'un agent réalisant une dissolution chimique des cellules, de préférence à l'aide d'un agent complexant spécifique du point de vue ionique, notamment du EDTA ou du EGTA.

9. Procédé selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce qui concerne les étapes a) et b) a) au

entre les étapes b) et c), la matière est stockée temporairement de façon stérile dans une solution isotonique avec refroidissement de préférence à 4°C moyennant l'addition d'antibiotiques si l'on est éventuellement stérilisé avec ménagements, de préférence par action d'un gaz ou d'un rayonnement, notamment avec un rayonnement γ , des ultraviolets ou des protons.

10. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que l'application des cellules sur la face extérieure de vaisseaux de forme tubulaire s'effectue à l'aide de liquides visqueux.

11. Procédé selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que dans la matière on introduit en outre un facteur de croissance, un facteur matriciel ou un facteur chimiotactique - de préférence à l'aide des cellules lors du peuplement, ou avant le peuplement, par introduction du facteur de croissance dans la matière, dont les cellules sont éliminées, ou après le peuplement par introduction du facteur de croissance dans la matière peuplée.

12. Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que pour le peuplement on utilise des cellules modifiées génétiquement, qui sont transformées ou transfectées avec un ou des facteurs de croissance avec des gènes, qui codent un ou des facteurs de croissance.

13. Procédé selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que le transplant obtenu est rangé, pour son stockage et son transfert, de façon siége dans des conditions réalisant une déshydratation.

14. Procédé selon l'une des revendications 1 à 13, caractérisé en ce que le tissu ou la matière halogénée ou xéogène, contenant du collagène, comprend les valves cardiaques, la peau, des vaisseaux, l'orteil, des tendons, la cornée, du cartilage, la trachée, les nerfs, le ménisque, le disque intervertébral, l'urétére, l'utérus et la vessie.

15. Transplant bionifical spécifique au receveur, qui est constitué par un tissu conjonctif interstitiel peuplé par endroit avec différentes cellules différentes autologues ou modifiées par la technique génétique, adaptées pour le receveur, notamment disponible au moyen d'un procédé selon l'une des revendications 1 à 14.

16. Transplant bionifical spécifique au receveur, qui est constitué par un tissu conjonctif interstitiel peuplé par un qui s'agit d'un organe parenchymateux.

17. Transplant selon la revendication 15, caractérisé en ce qui s'agit d'une valve cardiaque bionifical, qui est peuplée extérieurement, sur plusieurs

couche, par des microfibroblastes et l'infériorément par des cellules endothéliales, les surfaces étant respectivement complètement paupières de telle sorte que dans une large mesure aucune matrice de collagène n'est libérée en cet endroit.

18. Transplant selon la revendication 15, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un transplant de la peau, qui est peuplé extérieurement (sur le côté tourné à l'opposé du corps) par des kératinocytes et intérieurement (du côté du corps) par des cellules d'origine mésodermale, les surfaces étant paupières respectivement complètement de sorte que dans une large mesure aucune matrice de collagène n'est libérée en cet endroit.

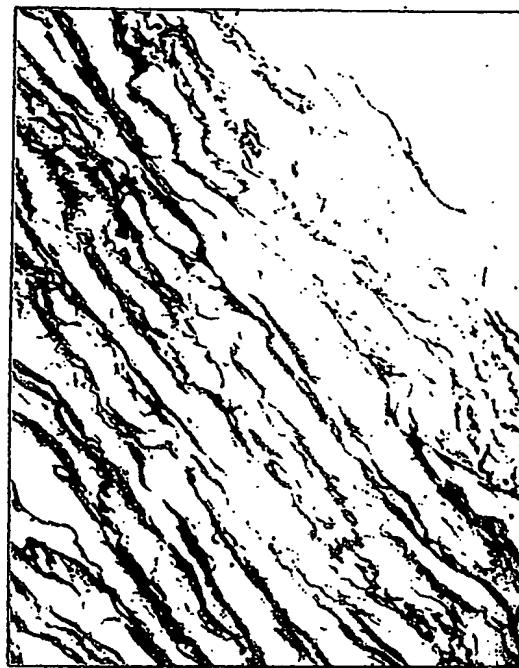


Fig. 1

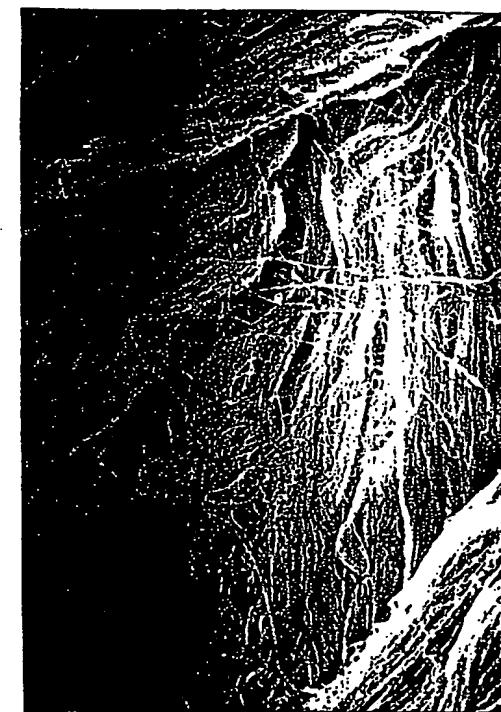


Fig. 2



Fig. 3